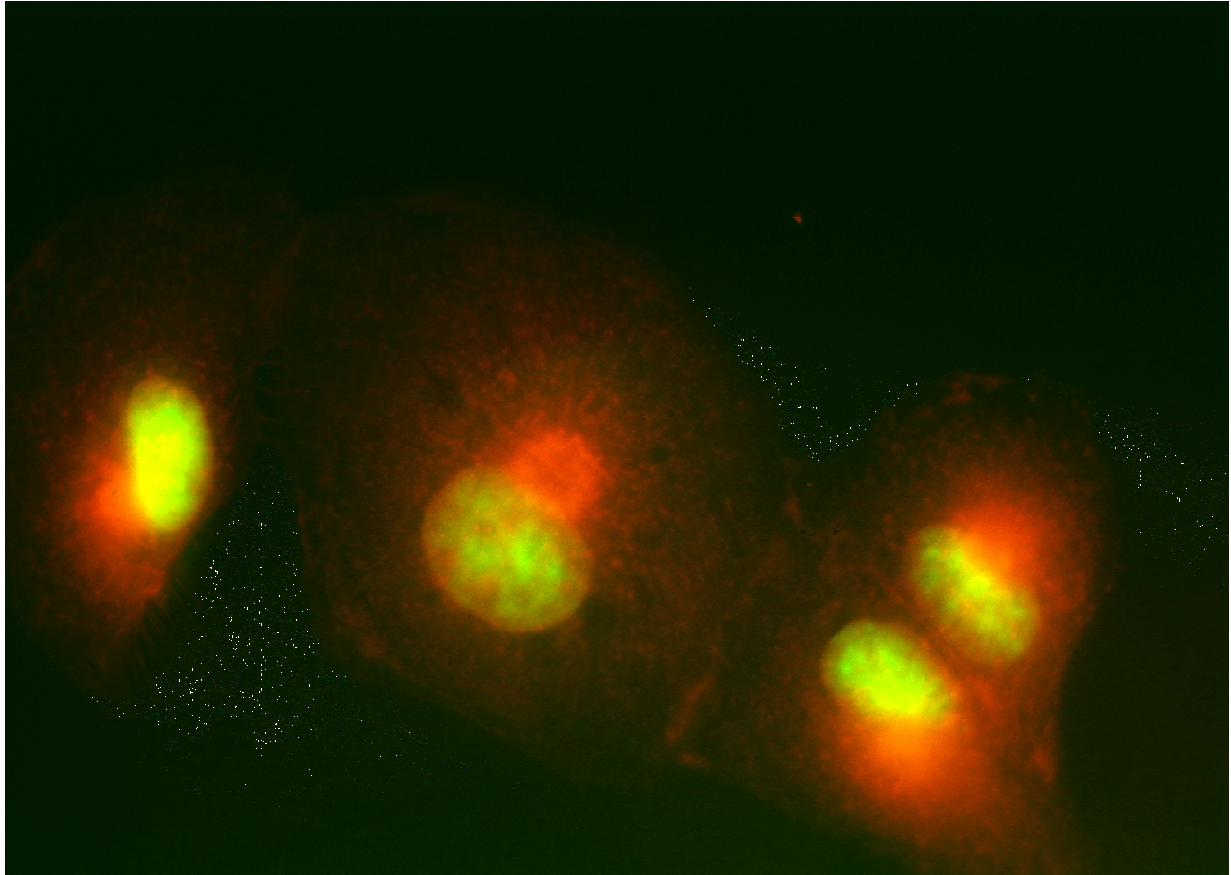


Karakterisering av A-kinase lokaliserende protein, AKAP450



Skriftlig oppgave for stud. med. Mette Eskild Bornstedt

Medisinsk fakultet
Universitetet i Oslo
Høsten 2005

Forord

Denne oppgaven er basert på et forskningsarbeid utført ved Institutt for Medisinsk Biokjemi, Universitetet i Oslo, under veiledning av professor Bjørn S. Skålhegg, Institutt for Ernæringsforskning, og professor Tore Jahnsen, Institutt for Medisinsk Biokjemi. Jeg var tilknyttet Skålheggs og Jahnsens laboratorier studieåret 2000/2001 der var engasjert som studentstipendiat på fulltid. Bjørn S. Skålhegg har vært veileder for min skriftlige oppgave.

I denne tiden arbeidet jeg med hovedprosjektet: ”AKAP450-et multifunksjonelt protein som er viktig for subcellulær lokalisering av PKA-aktivitet. Isoformer, struktur og funksjonelle egenskaper”. Mine delprosjekter var Prosjekt I: ”Karakterisering av de to RII bindingsdomenene til AKAP450” og Prosjekt II: ”Identifisering av et Golgi lokaliseringsmotiv på AKAP450”.

I tillegg til det praktiske arbeidet på laboratoriet, baserer oppgaven seg på artikler hentet fra Pubmed ved hjelp av søkeord som ”AKAP”, ”AKAP450” og ”PKA”. Artikler, avhandlinger og lærebøker som danner bakgrunn for oppgaven står oppført i referanselisten.

Jeg takker Norges forskningsråd som gav meg mulighet til å være studentstipendiat. Jeg ønsker å rette en stor takk til Tore Jahnsen og Bjørn Skålhegg for at jeg fikk arbeide hos dem med disse prosjektene. De har gitt meg meget god veiledning og oppmuntring underveis. En spesiell takk for at de inkluderte meg fullstendig i miljøet både faglig og sosialt. En særlig takk til Bjørn S. Skålhegg for all uunnværlig hjelp og støtte han ga meg til oppgaveskrivingen. Stor takk går til daværende stipendiat Oliwia Witczak som veiledet meg både teoretisk og praktisk gjennom arbeidet og tok meg med i sine prosjekter. Videre ønsker jeg å takke tekniker Sissel Eikvar og Pia Øistad for god praktisk hjelp og råd. Familie, Winnie Eskild, og venn, Åslaug R. Lorentzen, skal også ha takk for hjelp til oppgaven innholdsmessig og teknisk.

Innholdsfortegnelse

Abstract	s. 3
Innledning	s. 4
Signal transduksjon	
Protein kinase A og cAMP	
A- kinase anker proteiner, AKAPs	
Golgi struktur og funksjon	
AKAP450	
Materialer og Metoder	s.10
Målsetting og Resultater Prosjekt I	s.23
Målsetting og Resultater Prosjekt 2	s.28
Diskusjon	s. 32
Referanser	s.35

Abstract

Protein kinase A, PKA, regulates a number of cellular processes like metabolism, cell growth and differentiation and gene transcription. PKA becomes activated upon binding of cAMP to its regulatory subunits thus releasing the catalytic subunit. Four isoforms of the regulatory subunit have been described and are designated RI α and β and RII α and β .

Cyclic AMP is generated from ATP by the action of adenylyl cyclase after hormonal triggering of seven-span receptors coupled to heterotrimeric G proteins. PKA changes the phosphorylation level of certain substrates in the cell by phosphorylating either serine or threonine residues. The specificity of cAMP and thus the hormonal signal is partly determined by cellular targeting of PKA by A-Kinase Anchoring Proteins, AKAPs. AKAPs constitute a family of functionally related proteins which locate PKA and other signal molecules important for signal transduction to various subcellular structures including the Golgi-centrosomal complex. Previously an AKAP of 453 kDa designated AKAP450 was identified. AKAP450 contains two binding sites for the R-subunit of PKA. In order to characterize PKA-dependent features associated with AKAP450, wild type and mutated forms of the AKAP450 R-binding domains fused to GST were used in pull-down assays. Furthermore, Surface Plasmon Resonance was applied to describe the binding qualitatively and quantitatively. Together the results implied that RII has higher affinity for the C-terminal RII-binding site than the N-terminal binding site and that the α subtype of RII exhibits stronger affinity for the RII binding motive compared to RII β . Furthermore, AKAP450 and several AKAP450 related splice variants are transcribed from the AKAP450 gene which constitutes 51 exons. Immunofluorescence studies with antibodies against N-terminal, middle and C-terminal part of AKAP450, imply that AKAP450 locates PKA to the Golgi apparatus and the centrosome. Overlapping constructs of AKAP450 fused to GFP which were transfected into HeLa cells suggested that the N-terminal part, aa 1-1029 of AKAP450 may contain a Golgi targeting domain. Transfections of the N-terminal deletion fragment of AKAP450 destroyed the distinct staining of the Golgi apparatus. This may suggest that the endogenous AKAP450 plays an important role in sustaining the morphology of the Golgi.

Innledning

Signaltransduksjon

Mange hormoner overfører sine signaler fra utsiden av cellen til cellens indre ved å stimulere intracellulære signalveier. Etter å ha bundet seg til reseptorer på cellemembran aktiverer hormonene transmembrane proteiner som igjen aktiverer andre proteiner intracellulært. En får dermed en kaskade av reaksjoner som ender ut i en endring i cellen, for eksempel i enzymaktivitet eller transkripsjon.

En rekke signalveier har sin virkning ved å endre fosforyleringsnivået til regulatoriske molekyler i cellen, som for eksempler proteiner. Enzymer som fosforylerer proteiner kalles protein kinaser og katalyserer reaksjoner der en fosfatgruppe blir overført fra ATP til proteinet. Proteinfosforylering er ofte forbundet med aktivering. Defosforylering og dermed inaktivering forårsakes av fosfoproteinfosfataser.

Det er estimert at kanskje så mye som 20% av det humane genomet koder for transmembranreseptorer, protein kinaser, protein fosfataser og enzymer som er forbundet med intracellulær signalering. I dag kjenner en til en rekke ulike kinaser, hvorav proteinkinase A (PKA) er den første proteinkinase identifisert og er en av mest undersøkte proteinkinase en kjenner til (5).

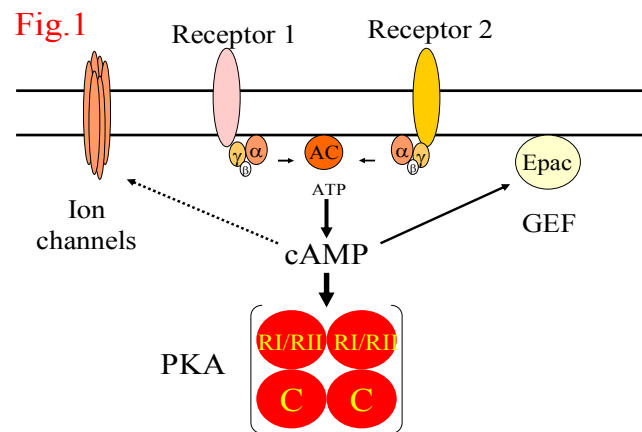
For å sikre tett regulering av fosforyleringen, og dermed hormonets virkning, er kinasene og fosfatasene nøye regulert av såkalte sekundære budbringere. Det er påvist en rekke sekundære budbringere hvorav Ca^{2+} og syklisk 3', 5'-adenosin trifosfat (cAMP) er av de best studerte.

Protein kinase A og cAMP

Syklisk AMP genereres fra ATP ved hjelp av enzymet adenylyl cyclase (AC) etter aktivering av transmembrane G-proteinkoblede reseptorer som sitter i cellemembranen. En av de viktigste reseptorene for cAMP er cAMP-avhengig protein kinase (PKA). PKA er et tetramert holoenzym som består av to katalytiske (C) og to regulatoriske (R) enheter. Syklisk AMP binder seg til to bindingssteder på R enheten. Ved binding av cAMP frigjøres C-enhetene som da kan fosforylere spesifikke substrater i aminosyrene serine og/eller treonin. Fosforylte proteiner regulerer en rekke prosesser i cellen som metabolisme, cellevekst og differensiering av cellen, samt transkripsjon av gener og ione kanaler (2).

Det finnes tre isoformer av C-enheten som kalles $C\alpha$, $C\beta$ og $C\gamma$ (19). De er nesten like hva angår kinetiske og kjemiske egenskaper. Videre finnes det fire isoformene av R som er kalt $RI\alpha$, $RI\beta$, $RII\alpha$ og $RII\beta$ (20). R subenhetene er ulike både når det gjelder cAMP-bindingskinetikk og lokalisering i cellen. For eksempel så binder $RI\alpha$ sterkere til cAMP enn $RII\alpha$, som igjen binder cAMP sterkere enn $RII\beta$ (21).

Syklisk AMP dannes fra ATP ved hjelp av adenylyl cyclase etter aktivering av transmembrane reseptorer. To molekyler cAMP binder seg til regulatorisk subenhet på protein kinase A, PKA, slik at katalytisk subenhet frigjøres og aktiveres. PKA fosforylerer signalproteiner slik at de blir aktive og viderefører således hormonsignalet intracellulært.



Alle PKA holoenzymer som inneholder henholdsvis RI og RII kalles PKA type I og PKA type II (PKAI og PKAII) (22). Vanligvis så er PKAI lokalisert i cytosol, mens PKAII, normalt er assosiert med subcellulære strukturer og organeller. For eksempel så har Keryer og hans gruppe vist at både $RII\alpha$ og $RII\beta$ binder til centrosomet via PKA-ankerproteiner (23).

A-Kinase Anchoring Proteins; AKAPs

Lokaliseringen av PKA og dermed effekter av cAMP skjer ved at dimeren av RII-subenhetene binder seg til ankerproteiner i cellen, A-kinase anchoring proteins; AKAPs, via den N-terminale enden på RII. Disse proteinene ble først identifisert som forbindelser som fulgte med RII når denne skulle renses opp. MAP2 var den første AKAP som ble funnet slik og er et mikrotubuliassosiert protein (24,30). Senere har det blitt oppdaget en rekke slike bindingsproteiner som utgjør en strukturelt mangeartet, men funksjonelt beslektet proteinfamilie siden de alle har det til felles at de lokaliserer PKA til spesifikke mikromiljøer i cellen. Per i dag er det beskrevet over 25 ulike AKAPer hos flere arter, inkludert menneske (Fig. 2) (5). Flere studier, blant annet med NMR, har vist at bindingen mellom RII og AKAP skyldes kontakt mellom hydrofobe aminogrupeer på begge proteinene. R-bindingsflaten på

AKAP består av en amfipatisk helix som interagerer med aminoenden av dimeren av R-enhetene (5).

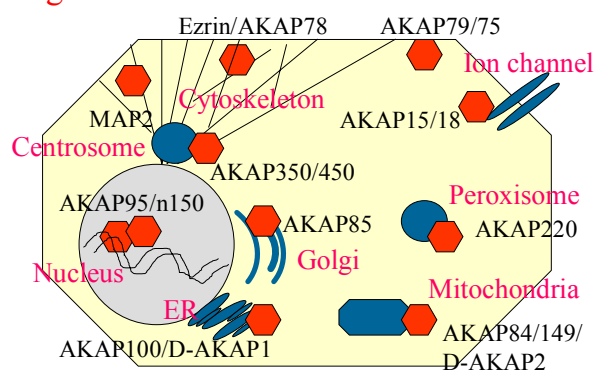
Det finnes et konserverert bindingsmotiv som er felles for flere undersøkte AKAPer (5). Hvorvidt alle AKAPer deler dette konsensus bindingsmotivet er ennå usikkert. De fleste slike studier har involvert RII, men en har også identifisert tre AKAPer som binder til RI (1).

I tillegg til veldefinert bindingssete for RII, har AKAPer bindingsmotiver unike for den enkelte AKAP som gjør at de binder seg til og lokaliseres spesifikt i cellen. Til i dag er disse mindre kjent, men stadig flere blir undersøkt. Ett eksempel er mAKAP, som bare finnes i hjertemuskelceller og som binder seg til perinukleær membran ved hjelp av tre spectrinliknende sekvenser (1).

Selv om AKAPer opprinnelig ble definert som proteiner som interagerer med PKA er det senere vist at de også kan binde andre signalenzymer, blant annet protein fosfataser. På den måten kan AKAPer virke som plattformer for enzymkomplekser og bringe dem til spesifikke steder i cellen, organeller og membraner, ved hjelp av unike bindingsmotiver (3). I tillegg har noen AKAPer evne til å samle flere enzymer i nærheten av organeller ved at de binder seg spesifikt til disse. AKAP220, AKAP79 og AKAP95 er alle eksempler på dette. AKAP220 binder både PKA, protein fosfatase 1 og glykogen syntase 3 β og assosierer med vesikler i cellen (3) mens AKAP 79 binder i tillegg til PKA, protein kinase C og protein fosfatase calcineurin. AKAP 79 regulerer ekspresjon og modulering av AMPA-glutamat reseptor i hippocampus ved henholdsvis fosforylering og defosforylering (2,3). Videre er AKAP95 et ankerprotein som finnes i cellekjernen og er assosiert med kjernemartix i interfase. AKAP95 er antatt å ha effekt på kromosomkondensering ved mitose (7). Et annet eksempel på en AKAP som binder flere signalmolekyler er AKAP450 som er lokalisert til Golgi-Centrosomområdet.

Det er identifisert over 25 AKAPer med ulike lokalisasjon i cellen, både intracellulært, i nærhet til organeller i cytosol og i tilknytning til cellemembranen. Her vises noen av dem, blant annet AKAP85 som var den første Golgi-lokaliserende AKAP som ble identifisert. AKAP350/450 assosierer med centrosomet som vist her, men også til Golgi som omtalt i teksten.

Fig.2



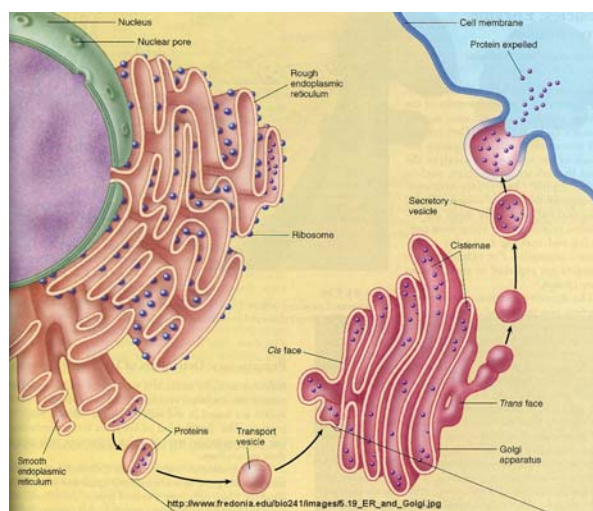
Golgi struktur og funksjon

Golgi apparatet eller Golgi komplekset er en stor organelle i cellen bestående av vesikler og avlange membransekker, cisterner. Golgi er lokalisert i umiddelbar nærhet til endoplasmatisk retikulum, ER. Dessuten er Golgiapparatet nært forbundet med centrosomet ved at Golgi alltid er lokalisert pericentriolært i humane celler (18). Golgikomplekset er en polarisert organelle. Nærmest ER finnes det ER-Golgi intermediære kompartementet, så følger cis-Golgi og Golgi sekkene før trans-Golgi som vender mot plasmamembranen. Hovedfunksjonen er å prosessere og sortere proteiner, samt syntetisere lipider og polysakkarider. Proteiner syntetiseres i ru endoplasmatisk retikulum, rER, med unntak av proteiner som skal til cytosol og som dannes på frie ribosomer. Golgi mottar proteiner som er syntetisert i ER og pakket i vesikler. Disse blir så videre prosessert og pakket i nye vesikler med adresse: endosomer, lysosomer, plasmamembran og ekstracellulær sekresjon. Glykosylering av proteiner og modifisering av glykosylgrupper dannet i ER er en viktig del av proteinmodifikasjonen. I tillegg til å modifisere proteiner blir det syntetisert glykolipider og sphingomyelin (8).

Golgi komplekset endrer morfologi gjennom cellesyklus slik at det fragmenterer ved mitose for så å bli regenerert igjen etter avsluttet celledeling. Fragmenteringen skyldes blant annet fosforylering av flere proteiner, inklusive CDK1. Et annet protein, GRASP, assosiert med Golgi, blir fosforylert av en annen kinase og det er foreslått at det fosforylerte GRASP spiller en rolle for reorganiseringen av Golgi. Studier har også vist at PKA er involvert i transportmekanismer fra ER til Golgi og gjennom Golgi til celleoverflaten (25). Det er foreslått at PKA er viktig for opprettholdelsen av Golgi-apparatet og at både eksocytose, endocytose og transcytose er regulert av PKA aktivitet (1,25,26).

Fig. 3

Etter translasjon av proteiner på rER pakkes proteiner i vesikler som transporteres til Golgi for videre prosessering, blant annet påhefting av glykosylgrupper. De ferdige proteinene pakkes så i nye vesikler med adresse endosomer, lysosomer og cellemembran.



A-kinase anchoring protein - AKAP450

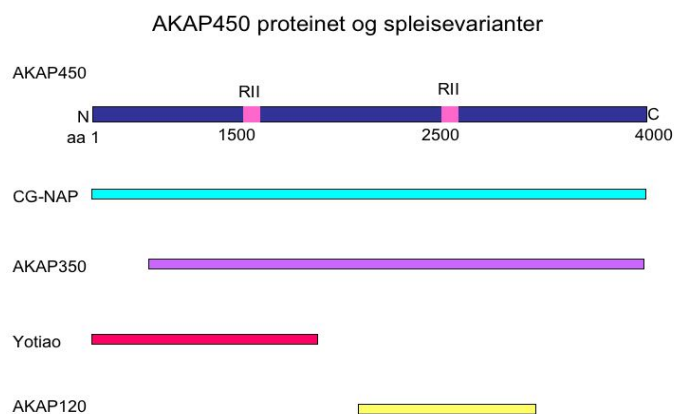
Full-lengde AKAP450 ble identifisert og klonet av Witzcak O. og medarbeidere ved hjelp av databasesøk, RII-overlay screening og PCR (7). Det var tidligere funnet at PKA lokaliserte til centrosomet og Golgi (Nigg *et al.* 1985). Alternativ spleising gir opphav til en familie av AKAP450-molekyler som har fått navnene AKAP350, AKAP450, CG-NAP og Yotiao (3). Disse AKAPene har evne til å binde kinaser, bla PKA, fosfataser, fosfodiesteraser, reseptorer og kanaler på henholdsvis tre steder i cellen: Golgi, Golgi og centrosomet og plasmamembranen.. Ved å samle en rekke signalenzymer har disse AKAPene evne til å innvirke på blant annet cellyklus, Golgifunksjon og funksjonen av kanaler i cellen. Yotiao er et ankerprotein som finnes i den nevromuskulære synapse og i hjernen, både i cortex, cerebellum og hippocampus. Proteinet interagerer med NMDA-reseptorer via subenheten NR1 og er involvert i bindingen av NMDA reseptoren til cytoskjelettet (8). AKAP350 ble identifisert i 1999 av Schmidt og medarbeidere som et AKAP protein som lokaliserte til både centrosomet og Golgi (32). Proteinet har et spesifikt biningsmotiv for Golgi lokalisert C-terminalt (aa 3259-3307) ulikt det for centrosomet (PACT-domene, aa 3308-3324). Trolig er lokaliseringen av AKAP350 cellyspesifikk siden transfeksjon av GFP-AKAP C-terminal del bare farget centrosomet i Jurkat celler, mens samme fragment farget også Golgikomplekset i HCA-7 celler (12). Takahashi og Ono identifiserte i 1999 et 450 kDa stort coiled-coil protein kalt CG-NAP (Golgi and Centrosomal localized PKN associated protein). De viste at proteinet assosierte med protein kinase N, protein kinase A, protein fosfatase 2A og protein fosfatase 1. CG-NAP lokaliserte til centrosomet gjennom hele cellyklus og til Golgiapparatet i interfase (11)

AKAP450 var altså et nytt protein på 453 kDa hvis cDNA besto av 3908 aminosyrer kodet for av 51 exons. Ved å sammenlikne sekvenser fant man at leserammen til AKAP450 inneholdt cDNA fra det tidligere karakteriserte Yotiao og human variant av AKAP120 (8). Det ble også senere vist at AKAP350, Yotiao og CG-NAP er spleisevarianter av AKAP450 og at disse således utgjør en familie av AKAPer utgått fra samme gen (3). Det ble vist at både AKAP350, AKAP450 og CG-NAP assosierer med centrosomet og Golgi. Studier viste også at de overnevnte AKAPene hadde to bindingssteder for RII subenheten av PKA, et N-terminalt og et C-terminalt. Man har også vist at forankringsproteinene kan binde andre enzymer som protein fosfataser PP1, PP2B, fosfodiesteraser og andre kinaser, blant annet protein kinase N og C (3). AKAP450 inneholder flere coiled-coil regioner, noe som er typisk for strukturelle proteiner og er funnet i flere proteiner lokalisert ved centrosomer, som pericentrin (27).

AKAP450 har 4 leucin-zippere som er foreslått av Takahashi og medarbeidere i deres arbeid med CG-NAP å være involvert i assosiasjon med andre proteiner (11). Siden AKAP450 også inneholder fire leucin zippere er det sannsynlig at noen av dem kan være involvert i interaksjon med andre proteiner (1).

Fig.5

Proteinet AKAP450 og spleisevariantene CG-NAP, AKAP350, Yotiao og AKAP120 vist skjematisk. CG-NAP og AKAP350 har til nærmet lik aminosyresekvens som AKAP450. Yotiao og AKAP120 har henholdsvis tilnærmet lik sekvens som AKAP450 N-terminalt og C-terminalt.



Materialer og Metoder

SDS-Polyakrylamid gelelektroforese

Prinsipp:

Separere proteiner etter relativ molekylstørrelse slik at de kan identifiseres, eksempel i en løsning med ulike proteiner. Proteinene er blitt negativt ladet etter behandling med SDS og beveger seg i porøs gel i et strømfelt fra negativ pol til positiv pol. Lengden proteinene vandrer i strømfeltet er proporsjonal med molekylstørrelsen. Omtrentlig molekylstørrelse kan bestemmes ved hjelp av å sammenlikne med standarder som er kjørt på samme gel.

Løsninger:

Separerende gel 10%: 3.6 ml dH₂O, 3.75 ml 1.5M Tris/0.4% SDS pH 8.0, 2.5 ml 40% 29:1 acrylamid/bisacrylamid, 5 µl TEMED, 50 µl 10% APS

Konsentrerende gel 4%: 3.3 ml dH₂O, 1.25 ml 0.5M Tris/0.4% SDS pH 6.8, 0.5 ml 40% 29:1 acrylamid/bisacrylamid, 5 µl TEMED, 25 µl 10% APS

Transferbuffer: 15.1 g Tris-base, 94.0 g glycine, 5.0 g SDS, dH₂O til 1 liter.

Blokke buffer: 25 g tørrmelkspulver, 0.5 g BSA, 5ml 2 % Na-azid, 2.5 ml Tween-20. Alt løses i 500 ml 1xPBS

10xSDS Running buffer: 30g Tris-base, 144g glycine, 100ml 10 % SDS, dH₂O til 1 L.

Prosedyre:

To glassplater vaskes med såpe og etanol og monteres med spacers i gelstativet. I avtrekkskap fylles separerende gel løsning til 4 cm opp på platen. Ha 2-3 ml 0.1 % Triton X-100 over separerende gel for å få jevn støpeflate. La gel polymerisere, ca 30 min og hell av detergenten. Sett i kammen med et valgt antall brønner og fyll opp med konsentrerende gel løsning. La gel polymerisere, ca 30 min. sett gel i elektroforesestativet og overfør til kammer med 1xSDS running buffer.

Preparering av proteiner og gelelektroforese: Proteinprøvene som skal appliseres på gel skal først denatureres. 25 µl protein blandes med 25 µl 2xSDS og 1 µl 1xSDS i eppendorfrør. Det lages hull i lokkene med nål og prøvene kokes i 5 min. Avkjøles på is. De denaturerte prøvene tilsettes "loading dye" og appliseres på gel sammen med molekylvektstandarter. Proteinekstraktene utsettes for et spenningsfelt på 100 V i ca 1 time.

Western blotting

Prinsipp:

Overføre separerte proteiner på gel til membran av nitrocellulose ved elektroblotting. Deretter kan den blottede membranen innkuberes med antistoffer eller radiomerkete proteiner slik at spesifikk binding kan visualiseres.

Løsninger:

Transfer buffer: 25mM Tris-base, 92 mM glycine, 20% metanol, dH₂O til 1 L

Blokke buffer: 1xPBS, 5% BSA.

1xPBS: 5 tabletter PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich), dH₂O til 1 L.

Prosedyre:

Elektroforesegelen løsnes forsiktig fra glassplatene og legges i kald transferbuffer for fukting sammen med 1 stk nitrocellulosemembran og 6 stk filterpapir som er klippet i samme størrelse som gelen. Det legges fra bunnen: 3 filterpapir, nitrocellulosemembran, gel og 3 filterpapir i transfermaskinen. Kjøres på 0.8 mA per kvadratcentimeter gel i ca 1 time. Etter blotting inkuberes nitrocellulose membranen i blokke buffer ved 4 grader over natt for å hindre uspesifikk binding.

RII-overlay

Prinsipp:

Vise spesifikk binding mellom to proteiner ved hjelp av radiomerkede proteiner. Merkede proteiner som har bundet seg til proteinet vil forbli bundet etter vasking på grunn av høy og spesifikk affinitet og kan visualiseres etter sverting på film og fremkalling av denne.

Løsninger:

³²P-merkeløsning: 50 µl RII (100ng/ µl), 25 µl RII (200ng/ µl), 2 µl C (400ng/ µl), 5 µl C (160 ng/ µl), 2 µl 1 M KHPO₄ pH 7.0, 0.8 µl 1M MgCl, 0.5 µl 2mM cAMP, 0.5 µl 100 mM DTT, 0.8 µl 10 µM ATP, dH₂O x µl. I hotlab tilsettes 6 µl 10 µCi/ µl γ-ATP (32P-merket)

Inkubasjonsløsning: 5 ml Blotto, 10 µl cAMP, 65 µl ATP, 600 µl EDTA, antiproteasehemmer, radiomerket RII-prøver.

PBS + T/T: 3 ml Triton, 0.5 ml Tween, 1xPBS til 1 L.

PBS m/ BSA og EDTA: 1xPBS med 1% BSA og 1mM EDTA.

Prosedyre:

^{32}P -merkeløsning lages i eppendorfrør på is i vanlig lab inntil γ -ATP skal tilsettes. γ -ATP er radioaktivt og alt videre arbeid skal skje på hotlab. Etter 1 times henstand tilsettes 3 μl 0.5 mM EDTA som stopper all aktivitet.

Sette opp nick column G-50 i stativ på hotlab og vaske denne med PBS med BSA og EDTA. Radiomerket løsning loades og det elueres 12 prøver a 100 μl i eppendorfrør ved å tilsette 100 μl PBS-løsning for hvert rør. 1 μl fra hvert rør tas ut og telles i tellerør. Forventer to topper; en fra radiomerket RII α og en fra frie merkete nukleotider.

Innkubere nitrocellulosemembranen med RII-bindingsmotivene til AKAP450 i inkubasjonsløsning ved 4 grader over natt. Vaske nitrocellulosemembranen 3 x 20 min med blockingbuffer i rystebad. Vaske med PBS + T/T til ikke radioaktivt mer. Tørke nitrocellulosemembranen ved 37 °C mellom to filterpapir i pleksiglassboks. Sveise tørr membran inn i plast. På mørkerom legges dette på film i lukket kassett og denne legges i -70 °C fryser. Hvor lenge filmene skal ligge til eksponering avhenger av hvor radioaktive prøvene er (våre lå 2-3 t). filmkassett tiner i 15 min ved romtemperatur før film fremkalles etter standard metode.

GST-pull down assay

Prinsipp:

Protein tagget med GST (glutathion-S-transferase), her: vill type og mutert RII-bindingsmotiv på AKAP450, bindes til glutathion agarosekuler slik at disse kan separeres fra andre proteiner. De bundne proteinene brukes som "agn" for et protein som en tror kan binde seg til dette, her: R-subenheter som er radiomerket med 8-azido[^{32}P]-cAMP. Etter inkubasjon og vasking kjøres proteinkompleksene på SDS akrylamid gel. Gelen tørkes/blottes over på nitrocellulosemembran og legges på film som fremkalles etter standard metode.

Løsninger:

E.coli proteinekstrakt

Bindingsbuffer: 50 mM kaliunfosfat pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 10 % glycerol, 1% Triton X-100, proteasehemmer.

Prosedyre:

E.coli proteinekstrakt tines på is og sentrifugeres 30 min på 70000 rpm (175000 x g) i en Beckman TLA-100 rotor. Ta ut 200 μl supernatant i rør. Tilsett 1-5 μl merkete protein

(fortynnet til 100 nM), her: radiomerket R-subenheter. til hvert rør og inkuber i 15 min på is. Sentrifuger i bordsentrifuge 15 min på maks hastighet ved 4 °C. Overfør supernatanten til små sentrifugerør.

Tilsett 20 µl GST-protein (100-250 µg/ml), her. RII-bindingsmotiv, bundet til agarosekuler til 200 µl av supernatanten fra E.coli celleekstrakt og bland godt. Bland dette med 200 µl supernatant fra E.coli celleekstrakt med merket protein. Blandingen inkuberes 1-2 timer ved 4 °C med forsiktig rysting. Sentrifuger i bordsentrifuge maks hastighet 1 min. Kast supernatant og vask kulene med bundet protein 3 ganger i Bindingsbuffer. Tilsett 25 µl 1xSDS til hver prøve og kok i 5 min. Prøvene kjøres på SDS-polyakrylamid gel (se omtale av metode over), tørkes og underkastes autoradiografi.

Protein måling på spektrofotometer

Prinsipp:

Proteinkonsentrasjon kan måles i et spektrometer ved 280 nm (OD 280nm). Dette skyldes absorpsjonen ved 280 nm av de aromatiske aminosyrene tryptofan, fenylalanin og tyrosin. Forholdet mellom absorpsjon og konsentrasjon beskrives av Lambert Beers lov: $A = \epsilon lc$, $\epsilon =$ ekstinksjons koeffisienten, $l =$ lysveien (1 cm) og $c =$ konsentrasjonen i mg/ml. ϵ settes til 1 i proteinblandinger.

Utstyr:

Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 spectrophotometer

Prosedyre:

Bruk "Basic" program og velg 280 nm på spektrofotometeret. Kalibrer apparatet med nullprøve. Mål absorpsjonen til prøvene. Regn ut konsentrasjonen ved hjelp av Lambert Beers lov.

Ekspresjon og opprensing av GST-protein

Prinsipp:

Uttrykke og separere proteiner med GST tag fra andre proteiner i et proteinekstrakt. Proteinekspresjonen induseres med IPTG. Cellene lyseres ved hjelp av MTBS og sonikering og GST-protein bindes til glutation-agarosekuler. Disse renses opp på glutathion-agarose søyler og ved påfølgende dialyse.

Løsninger:

2 x YT-medium: 16g Bactotrypton, 10g gjærekstrakt, 5g NaCl, dH₂O til 0.9 l, juster til pH=7,5 med 3ml NaOH 1M, dH₂O til 1 L, autoklaveres.

MTBS-løsning: lages samme dag som den skal brukes

150ml NaCl	15ml 3M		7,5ml 3M
16mM Na ₂ HPO ₄	9,6ml 0,5M	} Eller 12ml	4,8ml 0,5M
4mM NaH ₂ PO ₄	2,4ml 0,5M		1,2ml 0,5M
2mM EDTA	1,2ml 0,5M		0,6ml 0,5M
0,1% β-MeEtOH	300μl 100%		150μl 100%
0,2mM PMSF(NB!!Giftig) Løses i 1ml EtOH	9mg		4,5mg
5mM benzamidin	234mg		117mg
1% Triton X-100	3ml		1,5ml
dH ₂ O iskald	268,5ml		134,3ml
Totalt	300ml		150ml

Glutathion-løsning: per liter opprinnelig medie: 10ml 50mM TrisHCl pH 8.0, 45mg glutathion

RII-lagingsbuffer / Dialyse buffer: 5mM Hepes pH 7.6, 1mM DTT, 0.2mM PMSF, 1mM EDTA, 10% glycerol.

Coomassie Blue: 50% methanol, 0.05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% eddiksyre, dH₂O til 1 L.

Prosedyre:

Dag 1: Lage 2 x YT-medium. Sett opp overnatt, ON, bakteriekultur. Per liter 2 x YT-medium has 12.5 ml LB-plasmid, 12,5 μl amp (ampicillin) og 25 μl glycerolstock med BL21(DE3)codon+ celler som inneholder RGEX vektor med ønsket DNA fragment.. Lag negative kontroll uten glycerolstock: 10 ml LB-plasmid, 10 μl amp.

Dag 2: Oppgroing av bakteriekultur: per liter 2 x YT-medie tilsettes 12,5 ml overnatt bakteriekultur fra dag 1 og 400 μl amp. Blandingen settes i rysteinkubator, 220 rpm ved 37°C og gros til OD_{600nm} ≈ 0,4-0,5. Dette tar ca 2 timer og bakterieveksten er da i log-fase. .

Induserer med IPTG. Tilsette 0.4 mM IPTG tørrstoff (95.3 mg) per liter 2XYT-medie og inkuber i rysteinkubator, 220 rpm og 37°C, i ca 3 timer. Prøveekspresjon gjøres for å finne optimale betingelser for proteinekspresjon (her: 0.6 mM IPTG ON i rysteinkubator ved romtemperatur).

Ta ut prøve på 20μl og tilsett 20μl 2xSDS samplebuffer og kok i 5. min. Prøven skal kjøres på analysegel senere. Sentrifuger resten av kulturen 5 min ved 5000rpm ved 4°C og frys ned cellepeleten ved -70°C ON

Preparere glutathionkuler. Veie opp 150 mg glutathionkuler til 2 liter kultur i 15 ml snapkorkrør. Tilsett 6-7 ml iskald 1xPBS per rør. Sette på vippe 4°C minst 2 timer.

Sentrifuger 3-5 min ved 5000rpm og 4°C. Supernatanten fjernes og kulene vaskes i 1xPBS 3 ganger. Sentrifuger 3-5 min ved 5000rpm og 4°C mellom hver vask. Supernatanten helles fra og kulene oppbevares ved 4°C frem til bruk

Dag 3: Lag MTBS-løsning. Løsningen kan lages ferdig og lagres ved 4°C, men da må det ikke tilsettes β -MeEtOH, PMSF og benzamidin.

Pelleten med fryste celler løses i 15 ml MTBS per liter opprinnelig løsning. Settes på ristebord, full risting, ved 4°C. Alle løsningene helles sammen i et plastbeger på is og tilsett 20 mg lysosym per liter kultur. Løsningen står ved 4°C til den blir klumpete. Tilsett 702 U DNase og 400 μ l 1M MgCl₂ per liter kultur. Løsningen står ved 4°C til den blir tyntflytende.

Løsningen fordeles på tre 15 ml rør og sonikeres 3x45 sek på is. Sonikatet sentrifugeres 10000 rpm 10 min 4°C. Ta ut prøve av supernatanten til gel senere: 20 μ l supernatant og 20 μ l 2xSDS sample buffer. Pelleten kan fryses ned i tilfelle dårlig proteinutbytte.

Bland resten av supernatanten med preparerte glutathionagarosekuler i et 50ml Falconrør og innkuber løsningen på vippe ved 4°C i 1 time. Overfør løsningen til glutathionagarose kolonne på kjølerom. Samle opp flowthrough i et Falconrør, ta ut 20 μ l og tilsett 20 μ l 2xSDS samplebuffer til gel. Frys ned alt. Vask kolonnen med 1xPBS til OD 280 < 0.050.

Lag glutathionløsning (se løsninger). Tilsett 1 ml glutathionløsning til kolonnen og la den løpe gjennom. Lukk søylene etter tilsetting av 1.5 ml glutathionløsning. Vippes 30-45 min. 4°C. Sett opp kolonnen og samle opp fraksjoner: ca 6-7 1ml fraksjoner. Mål OD 280nm. Legg fraksjonene som er over OD 280nm 0.1 i dialyse i 25mm dialyseslanger i lagringsbuffer m/magnetrorer ON.

Dag 4: Dialysert protein kan tas ut til enzymkutting. Tilsett da 5 μ l thrombin (1 μ g/ μ l) og la stå i 1 time på is. Tilsett glutathionagarosekuler og 20 μ l 10% Triton X-100 og la stå på vippe i 30 min ved 4°C. Overføres til glutathionagarose søyle og eluer fraksjonene. Dialyseres i lagringsbuffer ON.

Dag 5: Proteinprøvene som er tatt ut underveis kokes og appliseres på SDS-polyakrylamidgel (for metode, se over). De eluerte proteinprøvene fryses ned ved -70°C. SDS-PAGE gelen farges med Coomassie Blue i 30 min ved 4°C og tørkes deretter i geltørker ca 1 time ved 80°C. (i geltørker legges fra bunnen:fuktet cellofan, filterpapir, gel og fuktet cellofan).

Golgifraksjonering

Prinsipp:

HeLa celler eller andre celletyper dyrkes, homogeniseres og spinnes for å isolere organellene i en postnukleær supernatant, PNS. Ved sentrifugering av PNS i en sukrose gradient med SW 28 rotor vil en oppnå en ren Golgi-fraksjon.

Løsninger:

Homogeniseringsbuffer: 0,25 M sukrose, 3 mM imidazol, pH 7.4

Sukroseløsninger: 1) 1.3 M sukrose, 15 mM CsCl, 1 mM HEPES

2) 1.15 M sukrose, 15 mM CsCl, 1 mM HEPES

3) 2 M sukrose, 15 mM CsCl, 1 mM HEPES

4) 0,9 M sukrose, 1 mM HEPES

Prosedyre:

Celler og løsninger holdes på is under hele prosedyren og det sentrifugeres ved 4 °C.

HeLa celler (> 100 mill celler) høstes fra 8 store celleflasker ved skraping. Cellene spinnes ned 5 min på 1200 rpm og vaskes 1 gang med 1xPBS i 10 min på 1000 rpm. Pelleten resuspenderes i 5 ml homogeniseringsbuffer og mixes godt ved å trekke suspensjonen opp og ned i en finpipette 12 ganger. Deretter homogeniseres cellene ved å trekke løsningen opp og ned 10x med en 5 ml sprøyte påsatt en S-bøyd 22G x 1 ¼ sprøytespiss. Homogenatet overføres til 15 ml rør og spinnes ned ved 2500 rpm i 10 min. Supernatanten (8.4 ml PNS) blandes med 6.6 ml 2M sukroseløsning. I ultrasentrifugeglass has fra bunnen 5 ml 1.3 M sukroseløsning, 5 ml sukroseløsning med PNS, 3 ml 1.15 M sukrose løsning og 2 ml homogeniseringsbuffer til sist på toppen. Løsningene legges forsiktig lagvis med en pasteur pipette og balanseres med 3 desimaler. Ultrasentrifugeres ved 28000 rpm i 4 timer ved 4 °C i en SW28 rotor. Skal kjøre uten brems. Nedbremsingen til sentrifugestans tar ca 2 timer.

Golgifraksjonen vises som ett eller to svake, blakkede bånd mot en mørk bakgrunn. Disse samles forsiktig opp med pasteurpipette og has i rør og oppbevares på is. Hurtigfrys rørene i flytende nitrogen og overfør til -70 °C for videre lagring.

GFP-delesjonskonstrukter av AKAP450

Delesjonsfragment 1-5 av AKAP450 (fig 9) ble amplifisert ved hjelp av PCR med primere som innførte restriksjonssteder slik at de kunne klones inn i GFP ekspresjons vektorer og AKAP450 cDNA som templat (Advantage polymerase mix fra Clontech) PCR produktene ble subklonet inn i pEGFP plasmidvektor som gjør det mulig å uttrykke proteinfragmentene tagget med grønt fluorescerende protein, GFP (18)

Ekspresjon av vill type og mutert AKAP RII- bindingsdomener

Prinsipp:

Ved hjelp av setespesifikk mutagenese introduseres mutasjoner i RII bindingsmotivene på AKAP450. Vektor med muterte fragmentene transfekteres inn i Ecoli XL1-Blue superkompetente celler. Bakteriekolonier gros opp og DNA renses opp ved hjelp av Snap Miniprep kit (Invitrogen). For å verifisere at vi har fått riktig DNA fragmenter kuttet det med restriksjonsenzymmer og kjøres på gel. DNA kan siden sekvenseres for å bekrefte introdusert mutasjon.

Løsninger:

PCR-løsning: 40 µl dH₂O, 5 µl. 10x reaksjonsbuffer, 2 µl. DNA templat, 1 µl. dNTP mix, 1 µl. lower primer, 1 µl upper primer, 1 µl. DNA polymerase pfu turbo.

LB medium: 10.0 g bactotryptan, 5.0 g gjærekstrakt, 10.0 g NaCl, dH₂O til 1.0 L, 3,0 ml 1 M NaOH til pH 7.0

1 % agarosegel: 1 g agarose, 100 ml dH₂O, 10 µl EtBr.

10XTBE-buffer: 108g Tris base, 55g borsyre, 20 ml 0.5 m EDTA, dH₂O til 1.0 L.

Primere: 5'GAAGAAGAACCAGCTAAGGTTATTGTGTCAATG'3

5'CATTGACACAATAACCTTAGCTGGTTCTTCTTC'3

Kit:

Quick Change Site-Directed Mutagenese Kit (Stratagene, La Jolla, CA)

Snap Miniprep kit (Invitrogen)

Prosedyre:

Mutagenese PCR: ønskede primere fortynnes til 10 pmol/ µl. Blande PCR løsning på is i PCR-lab. Programmerer følgende syklus: 95 °C, 30 sekunder, 55 °C 60 sekunder 68 °C i 13 minutter og 4 °C etter endt antall sykluser. Kjører i alt 18 sykluser. Tilsette 1 µl Dpn I etter

programslutt for å ødelegge ikke mutert DNA. Mikrosentrifuger 1min full hastighet og innkubere 1 time ved 37 °C for å fordøye parenteral DNA.

Transformasjon av mutert PCR produkt inn i Ecoli XL1-Blue superkompetente celler: XL1-celler tines og kvoterer ut 50 µl porsjoner i kalde rør. Tilsette 1 µl PCR produkt. La stå på is i 30 min. Transformasjonen skjer ved å ha rørene i 42 °C vannbad (heatshock) i 45 sek. Sette rør på is i 2 min. Tilsette 0.5 ml 42 °C LB medie og inkuber ved 37 °C med rysting i 1 time. Plate ut alt på agarplate med resistensmarkør, her: ampicillin. Innkuber ved 37 °C minst 16 timer. Ytterligere beskrivelse av prosedyre og materialer i håndbok fra produsent (Stratagene).

Isolering og opprensing av DNA med SNAP Miniprep kit: følg prosedyre slik den fremgår av håndboken som følger produktet.

Fordøying av DNA med restriksjonsenzym: Bland følgende løsninger: 1 µl DNA, 2 µl reaksjonsbuffer, 1 µl Xba restriksjonsenzym, 16 µl dH₂O og innkuber ved 37 °C i 3 timer.

Analyse av DNA på 1 % agarosegel: Lag agarosegel (se løsninger over).. Tilsett DNA prøvene 5 µl 6X loading dye. Appliserer prøvene på gelen sammen med DNA standarder; 123 bp DNA ladder og 1 kb DNA ladder. Kjøres på 80 V med 1XTBE-buffer til standardene har gått 2/3 av gelens lengde.

Ekspresjon av RII-subenheter

Preparering av R-subenheter er tidligere beskrevet (Herberg *et al* 2000). RI α , RI β , RII α og RII β ble uttrykt som GST-proteiner, renses og kuttet slik at de ble fullengde R subenheter med en N-terminal forlengelse. Disse ble brukt til RII-pulldown forsøk. For Plasmon Surface Resonance forsøk ble R-subenhetene overuttrykt i E.coli E222 celler. Disse ble opprenset ved hjelp av 8-AHA-cAMP affinitetskromatografi (Biolog, Bremen). R-subenhetene ble eluert med cGMP og stripping av cAMP med urea var derfor ikke nødvendig.

Transfeksjon av HeLa celler:

Prinsipp:

En vektor med ett ønsket cDNA fragment overføres til HeLa celler ved hjelp av strømpulser, elektroporering. Det tilførte DNAet blir så uttrykt i cellen. Subcellulær lokaliseringen av proteinet kan detekteres ved hjelp av antistoffer og GFP.

Løsninger:

Complete medium med HEPES: DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Sigma Aldrich), 10 % FCS (føtalt kalve serum), 15 mM Hepes

DNA-løsning: 50 µg vektor-DNA, 2.0 µl laksetestis DNA, 2.5 µl 3M NaCl og dH₂O til 50.0 µl.

Prosedyre:

Utgangspunkt 10×10^6 . HeLa celler. Cellene løses fra celleflaskene og prepareres ved å innkubere med EDTA i 5 min og deretter vaske med 1xPBS to ganger. Cellene løses i complete medium med Hepes og telles. Det beregnes hvor mye celleekstrakt en trenger per transfeksjon for å få 5×10^5 i 6. celler. Cellene spinnest ned og løses i 200 µl complete medium med Hepes. Cellesuspensjon blandes med 50 µl DNA løsning og overføres til steril elektroporeringskuvette. Elektroporer ved 210 V, 950 µF og ubegrenset motstand. Elektroporatet overføres til eppendorfrør med 1 ml complete medium med Hepes. Cellene løses i medium slik at vi får en konsentrasjon på 1×10^5 celler per ml. Preparerte coverslips (preparert med collagen og fibronectin over natt) vaskes med 1xPBS 3 ganger og legges i brønnene på celleplatene. Plat ut 0.5 ml celler per brønn og innkuberer disse ved 37°C.

Antistoffer

Materialer:

Antistoffer mot AKAP450: anti-AKAP450. Antistoff mot AKAP450 kalt anti-AKAP450a (SNO54) ble benyttet (Witczak O.). Antistoffet ble rensset opp på protein A søyler og fortynnet til konsentrasjon 10 µg/ml for Western blot og 5 µg/ml for immunofluorescens (7). Sekundære antistoffer: fortynning 1: 10000 til immunoblot (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West grove, PA.) (7)

Antistoffer mot Golgikomplekset: CTR433 (mAb), monoklonalt antistoff mot de midtre Golgi cisterner isolert fra humane KE37 lymfoblaster av Jasmin *et al* (29). CTR433 ble brukt som Golgi markør i fortynning på 1:50 og anti-mus-IgG ble brukt som sekundært antistoff (28).

Immunoblotting

Prinsipp:

Innkubere et immunoblot med antistoffer mot et protein som ønskes å detekteres. Det benyttes primært antistoff som binder seg til epitop på det aktuelle protein og sekundært antistoff som binder seg til dette. Sekundærantistoffene er vanligvis konjugert med fluorocromer eller enzymer for å visualisere assosiasjonen mellom primærantistoffet og dens

antigen. I våre oppsett så benyttes reaksjon med Horse Raddish Peroxidase der enzymet peroksidase er en del av sekundært antistoff og katalyserer reaksjonen: fluorforbindelse -> acridium ester ->eksitert produkt som avgir lys som sverter film. Filmen fremkalles etter standard metode.

Løsninger:

TBST: 1xTBS, 0.1% Tween-20

Blokkeløsning: TBST, 5% melkepulver, 0.02% Na-azid.

Kit:

Super Signal kit (Pierce Biotechnology)

Prosedyre:

Western blottet innkuberes over natt i blokkeløsning. Vaskes deretter i TBST 15 min ved romtemperatur, RT. Innkuberes med fortynnet primært antistoff 1 time RT. Vaskes i TBST 15 min ved RT og innkuberes med fortynnet sekundært antistoff 1 time ved RT. Vaskes til sist med TBST 15 min ved RT.

Blande like mengder lumenol/enhancer løsning og supersignal løsning fra kit. Ha blandingen over Westernblottet i 5 min. Tørke blottene med C-fold håndpapir. Monter blottene på Wattmannpapir og pakk inn i gladpack plastfilm. Legg på film i kassett i mørkerom. Eksponeringstiden skal være kort. Start med 1 min og vurder.

Immunofluorosensmikroskopi (IF)

Prinsipp:

Celler innkuberes med antistoffer mot spesifikke proteiner eller transfekteres med DNA fragment bundet til GFP. Cellene fikseres og permeabiliseres. Celler som er transfektert med GFP-cDNA kan mikroskoperes direkte da GFP-tag gir grønn fluorescens. Ved bruk av antistoff nyttes et primært antistoff som er spesifikt for det aktuelle protein og sekundært antistoff som er merket med et fluorescerende stoff. I lysmikroskop kan en da undersøke det aktuelle protein.

Løsninger:

Poly-L-lysine (0.01%)

Sigma (P4707)

1 x PBS (pH 7.4)

5 PBS tabletter
dH₂O til 1L, autoklaveres

PBST (0.01%)

50 mL 1 x PBS
5µL Tween 20

PBST-BSA (2%)

100mL 1 x PBS
10µL Tween 20
2g BSA

0.1% TX-100 in PBS

50mL 1 x PBS
50µL Triton X-100

3% PF (paraformaldehyd) i PBS

0.9 g paraformaldehyde (Sigma)
15mL dH₂O
1 dråpe 1M NaOH
juster til pH 7.2-7.6 med 0.1 M HCl
15mL 2 x PBS

Hoechst 33342 - Stock solution (1mg/mL)

1mg Hoechst 33342 pudder (bisbenzimide; Sigma)
til 1mL DMSO

Prosedyre:

Preparering av coverslips med poly-L-lysin: Coverslips innkuberes 5 min i 0.01 % Poly-L-lysin Tørkes deretter ved 50°C i 1 time eller romtemperatur i 4 timer. Til hver coverslips appliseres 100 µl celler, her: HeLa, som er fortynnet til 0.1-0.3 x 10⁶ celler/mL. La cellene sedimentere på coverslipsene i 45 min eller la dem gro der over natt ved 37°C. Legg coverslips på parafilm og tilsett noen dråper 1xPBS. Cellene fikseres og permeabiliseres: fikseres med 3% PF i PBS 15 min. Vaske 2x5 min i 1xPBS. Permeabiliseres med 0.1 % Triton X-100 i PBS 15 min. Vaske i PBS med 0.01% Tween 20 (PBST). Tilsett blokkingsbuffer, 2% BSA in PBST i 15 min.

Innkuber hver coverslip med 50 µl primært antistoff fortynnet i PBST-BSA 1:100 eller annen ønsket fortynning i 30 min. Vaske 3x5 min med PBST-BSA.

Innkuber med sekundært antistoff fortynnet i PBST-BSA 1:500 eller annen ønsket fortynning i 30 min. 50 µl per coverslip. Gjøres i mørke for å unngå at fluorescensen fader. Vaskes som over.

Innkuber coverslips med 50µL Hoechst (0.5µg/mL in PBST-BSA) i 5 min. Vaske med PBST-BSA 2 ganger. Legg coverslips med celleoverflaten ned på objektglass i 3µL CITIFLUOR™ - monteringsmedium. Forsegle med blank neglelakk og oppbevar mørkt ved 4°C.

Undersøke i Olympus BX61 mikroskop med F-VIEW digital kamera. Bruk software analySIS® (Soft Imaging System) for å ta og manipulere bilder.

Surface Plasmon Resonance, SPR:

Prinsipp:

Eksperimentene med SPR ble utført på en Biacore 2000 og 3000 maskin (Biacore AB, Sverige) av Dr. Friedrich Herberg (Kassel Universitet, Tyskland). På denne maskinen kan en måle interaksjonen mellom en immobilisert komponent, kalt ligand, og ett løselig molekyl. Når binding oppstår endres massen og overflatekonsentrasjonen. Den refraktive index endrer seg proporsjonalt med overflatekonsentrasjonen og gir endringer i SPR signal. Dette angis som Resonanse Units, RU og 1000 RU tilsvarer en overflatekonsentrasjon på 1 ng/mm² (Stenberg *et al.*, 1991).

Prosedyre:

En CM5 brikke ble dekket med cAMP (8-AHA-cAMP). Cyklisk-AMP frie R-subenheter ble bundet på denne overflaten. Brukte en overflatekonsentrasjon av den enkelte R-subenhet på 120-200 RU. AKAP proteinet, her AKAP450 i en konsentrasjon på 12nM til 1 µM, løper over overflaten i bufferløsning (20nM MOPS, 150 mM NaCl, pH 7,0 med 0,005 % P20) mens en registrerte bindingen ved hjelp av endret refrakjonsindeks. Assosiasjons og dissosiasjons hastigheter ble bestemt ved å bruke de ulike fortynningene av AKAP protein i henholdsvis 2 og 5 minutter og med flowhastighet på 30 µl/min. Nullprøver og referanseprøver ble brukt for å justere tallene.

For å se på den kvantitative bindingen mellom de fire isoformene av R-subenheten, RIα og β og RIIα og β og AKAP450 brukte en alle isoformene i varierende konsentrasjon og en fast konsentrasjon av AKAP450 på 200 nM.

Ut ifra dette kan man beregne hastigheter for assosiasjon og dissosiasjon mellom liganden og det som analyseres, her RII og AKAP450. De kinetiske konstantene ble beregnet med ikke-lineær regresjonsanalyse og ved hjelp av Biaevaluation 3.0 software. Den ikke-lineære regresjonen ble tilpasset med global fit analyse. Likevektsbindingskonstanten KD som er lik konstanten for dissosiasjon delt på konstanten for assosiasjon kan også beregnes (9, 10).

Prosjekt I:

Karakterisering av de to RII bindingsdomenene til AKAP450

Målsetting prosjekt I

De to RII bindingssetene i AKAP450 er lokalisert N-terminalt til aminosyre, aa, 1441-1457 og C-terminalt til aa 2548-2565. I tillegg til at AKAP450 sammen med pericentrin er det eneste kjente AKAP proteinet i centrosomet (1) så er det viste at RII α og RII β binder seg med ulik affinitet til centrosomet. Siden AKAP450 har to RII bindings seter og fordi centrosombundet RII α men ikke RII β blir frigjort når cellen går inn i mitose ved en CDK1 fosforyleringsavhengig mekanisme (31) så kan det tyde på at de to RII bindingssetene i AKAP450 har en differensiell affinitet for RII α og RII β .

Basert på dette så er det et hovedmål å måle affiniteten kvalitativt og kvantitativt for RII α og RII β for de to RII-bindingssetene i AKAP450 etter de første delmålene:

- 1) Beskrive bindingen mellom R-subenheten og AKAP450 kvalitativt.
- 2) Beskrive bindingen mellom R-subenheten og AKAP450 kvantitativt.
- 3) Bestemme bindingskinetikken, slik at vi får nøyaktige mål for interaksjonen.

Resultater prosjekt I

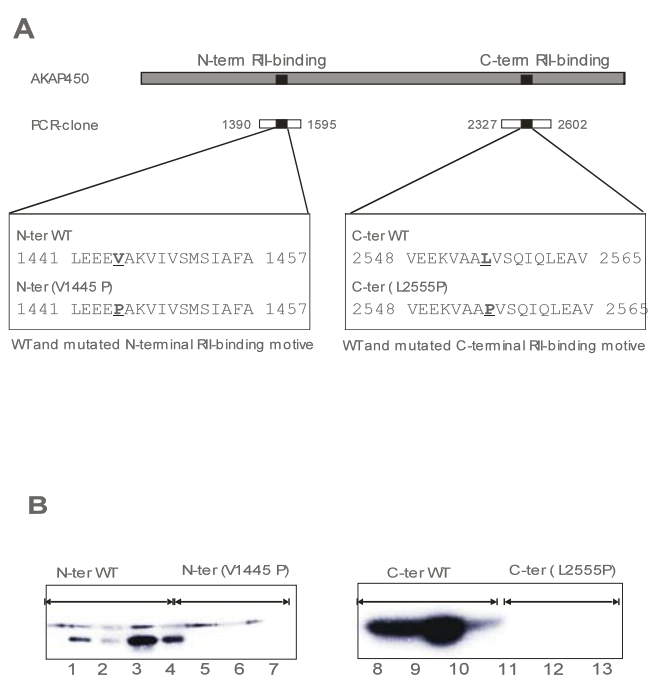
To DNA fragmenter fra AKAP450 som inneholdt det N- og C-terminale RII bindingssetet ble klonet med og uten mutasjoner og deretter subklonet inn i ekspressionsvektorer. I det N-terminale bindingssetet ble valin, V, mutert til prolin, P og i det C-terminale bindingssetet ble leucin, L, mutert til prolin, P (fig 6A). Basert på tidligere resultater og andres arbeid så er mutasjonene som ble introdusert antatt å ødelegge den hydrofobe overflaten i AKAP450 sitt RII bindingssete (1). DNA-fragmentene ble klonet inn i pGEX-KG vektorer og uttrykt i bakterier som GST koblede proteiner. De ulike proteinene ble separert ved hjelp av SDS-PAGE i 10% geler og deres kvalitative binding til RII analysert ved RII-overlay. DNA fragmentene med RII-bindingssete ble fremstilt i flere omganger. For å ikke blande de ulike batchene ble de applisert i hver sin brønn således at N-terminalt bindingssete villtype (WT) ble applisert i brønn 1-4 på RII-overlayet og tilsvarende bindingssete i mutert form i brønn 5-

7. På samme måte ble C-terminalt bindingssete WT applisert i brønn 8-10 og tilsvarende bindingssete i mutert form applisert i brønn 11-13 slik det fremgår av figur 6B. I figuren ser en at både N- og C-terminalt vill-type (WT) RII bindingssete binder RII (brønn 1-4 og 8-10), noe som ikke er tilfelle for de muterte formene (brønn 5-7 og 11-13). Dette stemmer overens med tidligere resultater; de introduserte mutasjonene ødelegger den hydrofobe bindingsflaten i RII-bindingssetet.

Fig. 6

A viser det N- og C-terminale RII bindingssetet på AKAP450. Under PCR fragmentene inneholdende henholdsvis aa 1441-1457 og 2448-2565 i villtype og mutert utgave. Aminosyren, aa, Val 1445 er mutert til Pro i det N-terminale fragmentet og aa Leu 2555 er mutert til Pro i det C-terminale fragmentet.

B viser RII-overlayet. PCR fragmenter med WT og Mut N- og C-terminalt RII bindingssete ble ekspressert som GST proteiner. Disse ble underkastet RII-overlay med 32P som merket RIIα probe. Lane 1-4 viser binding mellom RIIα og WT N-terminalt bindingsmotiv. Lane 5-7 viser binding mellom RIIα og Mut N-terminalt bindingsmotiv. Tilsvarende viser lane 8-10 binding mellom RIIα og WT C-terminalt fragment og lane 11-13 mellom RIIα og Mut C-terminalt fragment.



For ytterligere å studer om fragmentene også binder til RII i løsning ble GST- pulldown utført. De ulike R isoformene ble blandet med de ulike GST-taggete RII-bindingssetene og pull-down ble utført. Dette viste at vill-type men ikke de muterte bindingssetene trekker ned RII (Fig. 7A). I tillegg viser dette at verken vill-type eller mutert form trekker ned RI.

Fig. 7

"GST-pulldown". *RI α* , *RI β* og *RII α* , *RII β* ble radiomerket med 8-azido- (32 P)-cAMP og blandet med GST proteinfragmenter av villtype og mutert N- og C-terminalt *RII*-bindingssete. GST-

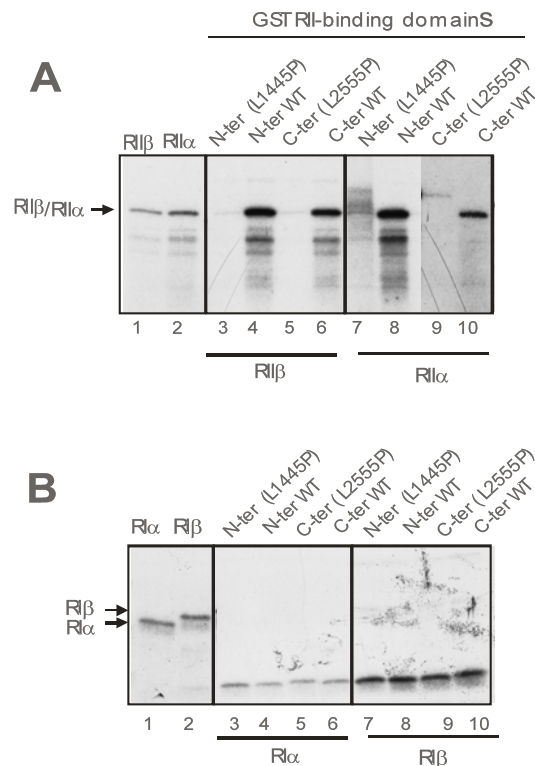
proteinene ble opprenset med glutathionagarose kuler og tilstedeværelsen av *RII* subenheter ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE og autoradiografi. Alle "pull-down" forsøkene er med både villtype og mutert N- og C-terminalt bindingsmotiv. I **A**

brønn 3-6 viser pull-down med *RII α* og brønn 7-9 med *RII β* . Tilsvarende ble gjort med *RI*-subenhete, vist i **B**. Brønn 3-6 viser pulldown med *RI α* og brønn 7-10 med *RI β* .

Forsøkene i figurene 6 og 7 viser at de to vill-type *RII*-bindingssetene i *AKAP450* er kvalitativt spesifikke for *RII* og ikke *RI*.

Surface Plasmon Resonance ble bare utført med *RII*- subenheter fordi *RI* ikke binder *AKAP* fragmentene som vist ved GST-pulldown. Resultatene som er fremkommet etter beregninger i *Biaevaluation 3.0* er vist i tabell 1 (9). K_{ass} sier noe om graden av assosiasjon mellom ligand og analytt og k_{diss} sier noe om graden av dissosiasjon av liganden fra analytt. K_D fremkommer ved å dele k_{diss} på k_{ass} og angir den molare bindings affinitet. Lavest verdi av K_D angir størst affinitet.

Hvis en først ser på det N-terminale bindingssetet ser en at k_{ass} , WT er 2.4 ganger høyere enn k_{ass} for mutert fragment mot *RII α* . Det ingen forskjell mellom k_{ass} WT og Mut N-terminalt bindingssete mot *RII β* . K_{ass} WT mot *RII α* er 1.6 ganger høyere enn k_{ass} WT mot *RII β* . Videre, er k_{diss} Mut mot *RII α* 4.1 ganger større enn k_{diss} for WT. Tilsvarende er k_{diss} Mut



mot RII β 4.5 ganger større enn k_{ass} for WT. Sammenligner en k_{diss} WT mot RII α med k_{diss} WT mot RII β så er den er 1.8 ganger høyere.

Når vi utførte tilsvarende målinger for det C-terminale bindingssetet viser dette at k_{ass} for WT mot RII α 82.9 ganger høyere enn tilsvarende k_{ass} for mutert form mot RII α .. Tilsvarende målinger utført mot RII β viser en forskjell i k_{ass} på 12.9. Forholdet mellom k_{ass} for det C terminale WT bindingssetet av RII α mot RII β er 2.6, mens det er 1.6 for det N-terminale setet. Hvis en studerer k_{diss} for det C-terminale setet og RII-subehetene ser en at k_{diss} er henholdsvis 9.4 og 10.0 ganger større for bindingen mellom WT og RII α og RII β og mellom Mut og RII α og RII β . Forskjellen i k_{diss} for bindingen mellom WT og RII α og RII β er 1.6, og dermed nesten helt identisk med forskjellen for det N-terminale bindingssetet på 1.7.

Til sist, hvis en sammenlikner K_D for det N- og C terminale bindingssetet finner vi følgende forskjeller: K_D er 10.0 ganger høyere for assosiasjonen mellom N-term Mut og RII α enn for N term WT og RII α . Tilsvarende ulikhet for K_D , for RII β er 4.9. For det C-terminale setet er forskjellen i K_D mellom Mut og WT mot RII α hele 756.0. Tilsvarende forskjell mot RII β er 128.0. Høyest K_D verdi angir lavest bindingsaffinitet slik at lavest verdi for K_D vil si sterkest binding mellom molekylene.

Disse dataene er også fremstilt i fig 8 (9). Figuren viser at K_{ass} for både N- og C-term WT er større enn for de muterte formene. Likeledes er K_{diss} mindre for WT- formene enn de muterte bindingsetene. Dette gjelder både for RII α og RII β .

Tabell 1

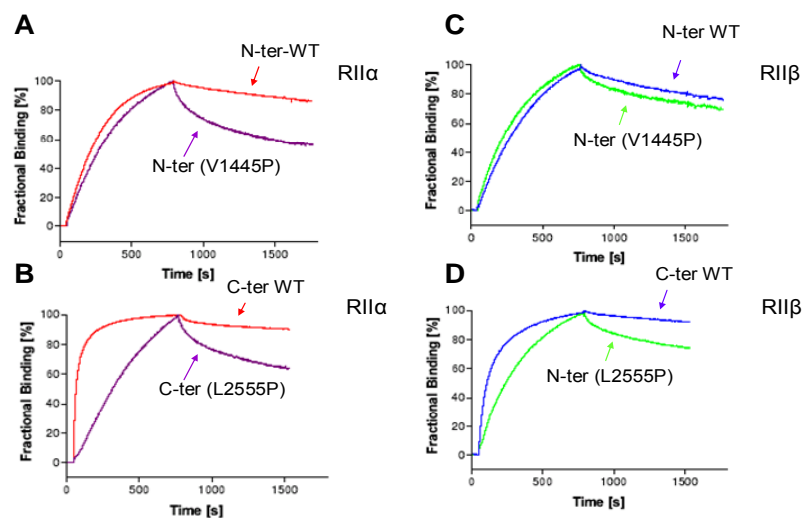
RII-bindings motiv	R subenhet	K_{ass} ($10^4 \times \text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$)	K_{diss} ($10^{-4} \times \text{s}^{-1}$)	K_D (nM)
N-term WT	hRII α WT	6.0 +/-1.2	7.3 +/-1	12.0
	hRII β WT	3.75 +/-1.7	13 +/-6.5	35.0
N-term (V1445P)	hRII α WT	2.5 +/-0.8	30 +/-2.2	120.0
	hRII β WT	3.5 +/-0.2	59 +/-14	170.0
C-term WT	hRII α WT	116 +/- 53	4.7 +/-0.5	0.41
	hRII β WT	45 +/-0.3	2.7 +/-0.4	0.60
C-term (L2555P)	hRII α WT	1.4 +/-0.3	44 +/-1.9	310.0
	hRII β WT	3.5 +/-0.3	27 +/-2.7	77.0

Tabell over k_{ass} , k_{diss} og K_D for N- og C-terminalt bindingsmotiv i villtype og mutert utgave i interaksjon med RII α og β .

Fig. 8

Interaksjon mellom vill type og mutert N- og C-terminalt bindingsmotiv og RII- subunits. En sensorbrikke med 8-AHA-cAMP ble brukt til å fange RII α og RII β i løsning. Vill type og mutert N- og C-terminale RII bindingsmotivfragmente

r var i kontakt med de immobiliserte RII-subenhetene en gitt tid. Binding medførte endring i refraksjonsindeksen. Denne endringen ble brukt til å beregne interaksjonen. Her vises bindingsfraksjonen i prosent varierende med tid for alle fragmentene.



Konklusjon prosjekt I

- Punktmutasjon av bindingssetene for RII på AKAP450 gjør at RII ikke lengre kan binde seg, vist ved RII-overlay og GST-pulldown.
- Bindingsdomenet er spesifikt for RII og AKAP450 assosierer ikke med RI-subenheten, vist ved GST-pulldown.
- Både RII α og RII β har høyere bindingsaffinitet for det C-terminale bindingsmotivet enn det N-terminale bindingssetet.
- Det ser ut til at RII α generelt har sterkere affinitet enn RII β for begge RII-bindingsmotivet på AKAP450.

Prosjekt II:

Identifisering av et Golgi lokaliseringsmotiv på AKAP450

Målsetting prosjekt II

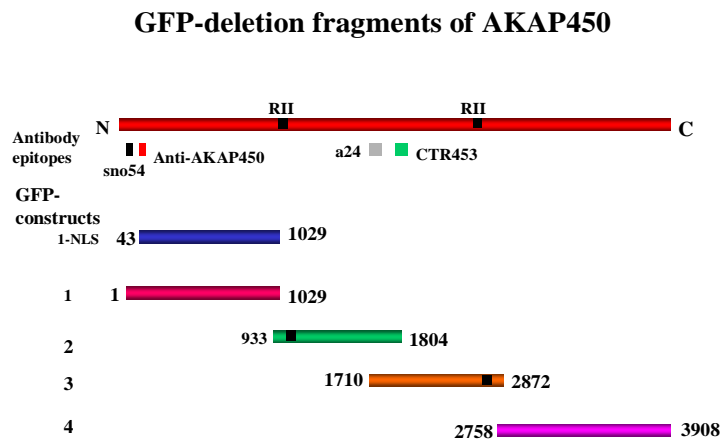
Witczak og medarbeidere har vist at AKAP450 assosierer med centrosomer via et spesifikt bindingsmotiv lokalisert C-terminalt på proteinet (7). Dette er vist ved immunofluorescens studier med HeLa celler transfektert med delesjonsfragmenter av AKAP450 der antistoffer mot AKAP450 og centrosomer er brukt. Under dette arbeidet viste det seg også at antistoffer mot AKAP450 farget et område i cellen i nærheten av centrosomene. Dette så ut til å være Golgiapparatet, verifisert med antistoffer rettet mot ulike deler av Golgi (18). Utifra dette ønsket vi å se nærmere på AKAP450 sin assosiasjon til Golgi:

- 1) Vise lokalisering av AKAP450 til Golgiapparatet ved immunofluorescens.
- 2) Identifisere hvilken del av AKAP450 som har et bindingsmotiv for Golgi ved å transfektere celler med ulike delesjonskonstrukter av AKAP450.
- 3) Undersøke bindingen til Golgi nærmere ved å se om AKAP450 binder seg til en ren Golgifraksjon.

Resultater prosjekt II:

Vi ønsket i utgangspunktet å bekrefte assosiasjonen av AKAP450 til Golgi-centrosomkomplekset. Permeabiliserte HeLa celler ble inkubert med antistoff rettet mot ulike deler av AKAP450 (fig.9) og antistoffer rettet mot Golgi-centrosom komplekset, (klonene CTR453 og sno-54). Antistoffer bundet til enten AKAP450 eller Golgi-centrosomkomplekset ble visualisert med sekundærantistoffer bundet til fluorokromer.

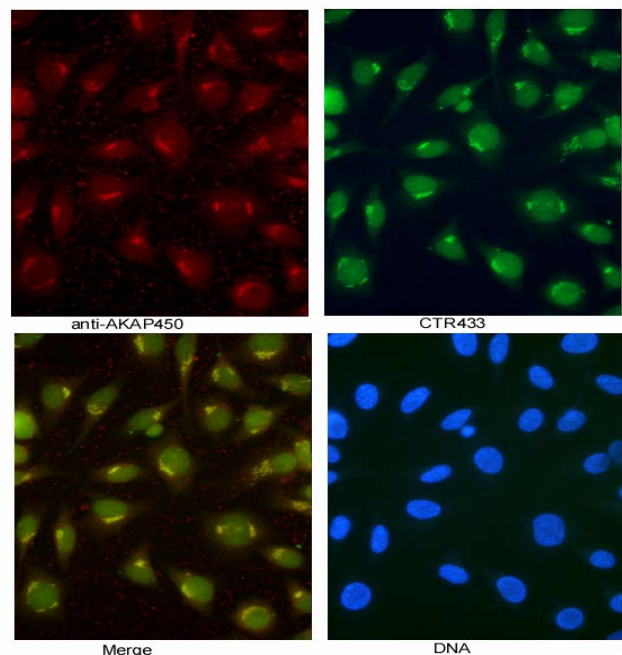
Fig. 9



Skjematisk oversikt over AKAP450 med de to RII-bindingsdomenene (øvre rød stolpe). Under den røde stolpen er vist lokaliseringen av de ulike epitopene for antistoffer sno 54, anti-AKAP450, a24 og CTR453. Under disse en skjematisk presentasjon av GFP-fragmentene som ble brukt i transfeksjonene. En ser at de er overlappende og at fragment 2 og 3 inneholder hver sitt RII-bindingssete. Konstrukt 1-NLS tilsvarer konstrukt 1 bortsett fra et kjernelokaliserende signal som er fjernet.

Fig. 10

Øverste bilde til venstre viser HeLa celler farget med anti-AKAP450 (SNO54). Øverste bilde til høyre viser HeLa celler farget med Golgimarkør CTR433. Nederste bilde til venstre viser de to bildene lagt over hverandre (merge). Siste bilde nedrest til høyre viser DNA farget med DAPI (Farger DNA). Bildene viser presis overlapp og dermed fullstendig samlokalisering av AKAP450 og Golgi-centrosom komplekset.

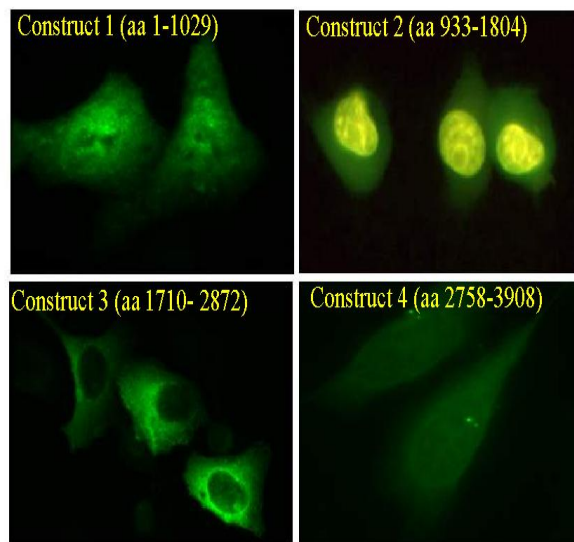


Vi fant fullstendig co-lokalisering av AKAP450 og Golgi-centrosomkomplekset (fig.10).

For å nærmere bestemme hvilken del av AKAP450 som assosierer med Golgi-centrosomkomplekset lagde vi overlappende delesjons-DNA fragmenter av AKAP450 (Fig.9) som ble klonet inn i den mammalske ekspresjonsvektoren pEGFP. Ved transfeksjon i mammalske celler vil denne vektoren utrykke de ulike fragmentene som har protein (peptid) fusjonert til grønt fluorescerende protein, GFP. Ekspresjonsnivået på cellenivå kan studeres ved hjelp av immunofluorescensmikroskopi.

Fig. 11

Transfeksjon av HeLa celler med GFP fragmenter av AKAP450. Øverste bilde til venstre viser transfeksjon med delesjonsfragment 1. Øverste bilde til høyre viser transfeksjon med delesjonsfragment 2. I de to bildene under vises henholdsvis resultat med GFP-konstrukt 3 og 4.



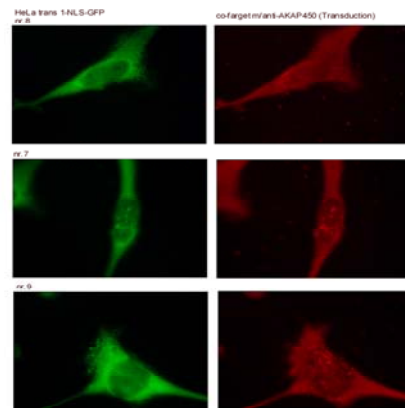
Dette viste at fragment 1 og 2 lokaliserer til både cytosol og cellekjernen, mens fragment 3 og 4 lokaliserer til henholdsvis cytosol og centrosomet (Fig.11). Kjerne-lokalisering av det N-terminale GFP-fragmentet medførte at vi analyserte aminosyresekvensen av AKAP450 nærmere og fant ut at fragmentet inneholdt et kjerne-lokaliseringssignal (NLS, nuclear localization signal) som sannsynligvis først ble eksponert når den naturlige strukturen av AKAP450 var brutt. Vi konstruerte derfor ett nytt GFP-konstrukt som ikke inneholdt NLS og kalte det 1-NLS. Vi så da at fragment 1-NLS ikke farget nukleus mer, men bare cytosol. Vi

fant også at den distinkte fargingen av Golgi-centrosomkomplekset vi hadde sett tidligere var borte. Fargen og dermed hele proteinet så ut til å være spredd diffust ut i cytoplasma.

Fig. 12

Bildene(1-3) til venstre viser HeLa celler transfektert med 1-NLS-GFP. I bildene(1-3) til høyre er det co-farget med anti-AKAP450 (SNO54). Bildene viser at den distinkte Golgi fargingen er borte og at proteinet synes spredd ut i cytoplasmaet.

HeLa cells transfected with 1-NLS-GFP, costaining with anti-AKAP450



Konklusjon prosjekt II

- Antistoffer mot AKAP450 farger Golgiapparatet i cellen.
- Transfeksjon med GFP-delesjonsfragment 1-NLS fører til at den distinkte fargingen av Golgi forsvinner.

Diskusjon

Det er mye interesse og spørsmål rundt hvordan spesifisiteten ivaretas i intracellulære signalveier. Mange hormoner genererer de samme sekundære budbringerene. Til tross for dette fører alltid et hormons stimuli på cellen til et spesifikt svar intracellulært. I løpet av de siste tjue til tredve årene har ulike forskningsgrupper identifisert og beskrevet forankringsproteiner som samler og lokaliserer signalenzymer, som kinaser og fosfataser, til spesifikke steder og organeller i cellen. Således kan disse virke i sitt mikromiljø, uten å forstyrre andre prosesser i cellen. Dette er med på å forklare noe av den spesifisitet som en registrerer etter at ulike hormoner stimulerer en og samme celle via det samme sekundære budbringersystemet. I tillegg til spesifisiteten, er en presis lokalisering med på å øke effektiviteten i signaltransduksjonen (2).

Fra tidligere av er det kjent at PKAII assosierer med Golgi-centrosomkomplekset (Nigg *et al*, 1985, ref 17). Senere er det blitt klart hvilke forankringsproteiner som lokaliserer PKAII til disse organelle. Schmidt og medarbeidere identifiserte et 350 kDa RII-bindingsprotein, AKAP350, lokalisert til centrosomet i 1999 (32). I 2002 viste Goldenring og hans gruppe at AKAP350 lokaliserer til Golgi apparatet ved hjelp av et unikt bindingsmotiv, ulikt det for centrosomet (12). Takahashi og hans gruppe fant og beskrev i 1999 et 450 kDa stort protein som de kalte CG-NAP og som bandt RII α (11). I tillegg viste Witczak og medarbeidere et protein som senere viste seg å være identisk med CG-NAP, som de kalte AKAP450 som også assosierte med Golgi-centrosom området (7). Det ser ut til at da de ulike forskningsgruppene publiserte sine resultater om forankringsproteinene var de ikke kjent med de andres arbeider og presenterte derfor sin AKAP som et helt nytt protein. I ettertid er det vist at overnevnte proteiner tilhører en familie av AKAPer som har sitt opphav i et felles gen på kromosom 7q21-22. Alternativ spleising gir opphav til både AKAP350, AKAP450, CG-NAP og Yotiao (3). Ved å sammenlikne cDNA for AKAP450 med andre proteiner i genomet viser det seg at både AKAP350 og CG-NAP har 99% likhet med nukleotidsekvensen til AKAP450 (BLAST, nukleotid-nukleotid søk i NCB). Det vil være svært interessant å få kunnskap om hva som regulerer de forskjellige genuttrykkene og hvor like eller ulike de ovennevnte AKAPer faktisk er funksjonelt.

I denne oppgaven beskrives noen sider ved det PKA lokaliserende protein, AKAP450, som lokaliserer to molekyler PKA til Golgi-centrosom området. AKAP450 kan binde to molekyler PKA samtidig fordi det har to bindingssteder for RII- subenheten. Initielt i denne

oppgaven beskrev vi kvalitativt og kvantitativt bindingen mellom RI og RII-subenheten og vill-type og mutert form av de to RII-bindingsdomene. Vill-type fragmentene av de to RII-bindingssetene ble PCR klonet og tilsvarte det N- og C-terminale RII bindingssetet i AKAP450. Mutasjon av de to fragmentene ble gjort ved sete-spesifikk mutagenese (se Materiale og Metoder). Disse fragmentene ble separert på SDS-PAGE og ved RII-overlay viste vi at både RII α og RII β binder seg til vill-type RII-bindingsfragmentene, men ikke til de muterte formene. Dette viser at mutasjonen av de to fragmentene var vellykket med tanke på å ødelegge deres evne til å binde RII. Siden dette ikke forteller noe om evnen til å binde RI gjorde vi i tillegg GST pull-down forsøk som viste at RII men ikke RI ble dratt ned spesifikt av vill-type fragmentene og at i disse forsøkene så ble verken RI eller RII trukket ned med de muterte fragmentene. Til sammen viser dette at de to RII-bindingssetene i AKAP450 er RII-spesifikke. Resultatet vårt stemmer overens med at det tidligere er rapportert av blant annet Witzcak og medarbeidere at bare PKAII og ikke PKAI assosierer med centrosomet via AKAP450 (1) og viser i tillegg at begge RII bindingsdomenene er funksjonelle.

For å undersøke bindingen mellom AKAP450 og RII mer i detalj ble det utført kvalitative og kvantitative analyser av bindingen ved hjelp av Surface Plasmon Resonance (se Materialer og Metoder). Vi kunne da få svar på om det var forskjell i bindingsaffiniteten til det N- og C-terminale RII-bindingsmotivet og om en ut i fra dette kan forutsi noe om de ulike R-isoformene vil binde seg til AKAP450 med ulik affinitet.

Analysene viste at både RII α og RII β har høyere bindingsaffinitet for det C-terminale bindingsmotivet enn de har for det N-terminale og at RII α generelt har høyere affinitet enn RII β for bindingsmotivet på AKAP450. Dette er i delvis overenstemmelse med resultater fra Keryer som undersøkte ekspresjonen og binding av RII α og RII β til centrosomet (16). De fant at RII α lokaliserte både til cytosol, Golgi apparatet og centrosomet mens RII β kun var lokalisert til Golgi og til selve centrosomet (16).

Ut i fra vår viten om AKAP450 som et forankringsprotein assosiert med centrosomet og Golgi (1) ønsket vi i utgangspunktet å bekrefte assosiasjonen av AKAP450 til Golgikomplekset og å studere om det er spesifikke områder av AKAP450 som lokaliserer proteinet til dette og andre områder inne i cellen. Ved bruk av antistoffer rettet mot AKAP450 kunne vi vise at disse var immunreaktive mot Golgiapparatet og at de samlokaliserte med et antistoff som farger Golgikomplekset. Til sammen bekrefter dette AKAP450 sin lokalisering til Golgi-centrosomområdet.

For å nærmere bestemme hvor et eventuelt bindingsmotiv kunne ligge i AKAP450 proteinsekvensen ble det laget fire delesjonsfragmenter med GFP-tag ved hjelp av PCR. Disse

ble transfektert inn i HeLa celler og visualisert ved hjelp av fluorescensmikroskopi for. Dette viste at GFP-delesjonsfragment 1-NLS (N-terminalt fragment av AKAP450 uten kjernelokaliserende signal) farger cytosol i et diffust mønster. Dette resultatet kan bety at den N-terminale delen av AKAP450, aa 1-1029, fortrenger det endogene molekylet når den blir transfektert og fører til at Golgi-strukturen oppløses. For at dette skal være tilfelle så må dette fragmentet sannsynligvis inneholder et område som gjenkjenner og binder til Golgi. Hvis dette er tilfelle kan det tyde på at AKAP450 påvirker Golgi-morfologien (18). Shanks og medarbeidere har identifisert et C-terminalt bindingssete for Golgi på AKAP350 (12). De viste ved å lage små delesjonsfragmenter av den C-terminale enden at en 48 aminosyrer lang region var tilstrekkelig for assosiasjon med Golgi. Våre studier kan tyde på at det eksisterer et N-terminalt bindingsmotiv for Golgi lokalisert et sted mellom aminosyre 1 og 1029. Dette kan bety at det finnes både et N- og et C-terminalt bindingsmotiv i AKAP450 som lokaliserer til Golgi. For å undersøke dette bindingsmotivet nærmere kunne vi ha laget mindre delesjonsfragmenter av den N-terminale enden og transfektert HeLa celler med disse. Immunohistokjemi med større oppløselighet kunne da indikere hvilken region N-terminalt som var ansvarlig for assosiasjonen med Golgi. Ved å bruke antistoffer rettet mot ulike deler av Golgi, kunne en også få svar på om AKAP450 assosierte med cis, medial eller trans Golgi.

Vi klarte ikke å vise at AKAP450 binder seg til en opprenset Golgifraksjon (resultat ikke vist). Det kunne skyldes selve metoden for Golgiopprensing. Kanskje opprensingen ødelegger strukturer eller proteiner på Golgi som er vesentlig for assosiasjonen mellom AKAP450 og Golgi. Dessuten er det mye som tyder på at AKAP450 ikke binder seg direkte til Golgiapparatet, men assosierer med dette i umiddelbar nærhet (1). Golgi er lokalisert pericentrosomalt (18) slik at AKAP450 kan være assosiert med Golgi via den pericentrosomale matrix eller mikrotubuli. Uansett blir det spennende å se hvilke mekanismer og eventuelt bindingsproteiner som lokaliserer AKAP450 til Golgi. Videre er det av stor interesse å finne ut hvilken funksjon AKAP450 utøver på Golgiapparatet.

I tillegg til å ha betydning for morfologien til Golgi (18), virker AKAP450 som en plattform for kinaser og fosfataser som kan synes viktig for selve Golgi dynamikken (18). Det vil være interessant å finne ut om det skjer noen interaksjon mellom disse enzymene og hvordan binding til forankringsproteinene regulerer deres aktivitet. Fremtidige studier vil kunne belyse og bringe klarhet i disse aspektene.

Referanser

1) Witczak O. (2002). AKAP 450- a PKA anchoring protein involved in the structural and functional organization of the centrosome and Golgi apparatus. Doktorgradsavhandling utgått fra det medisinske fakultet

2) Colledge M, Scott JD (1999). AKAPs: from structure to function. Trends in Cell Biology (vol. 9): 216- 221.

3) Langeberg LK, Scott JD (2005).A-kinase anchoring proteins. Journal of Cell Science 118: 3217-3220.

4) Lester LB, Scott JD (1997).Anchoring and scaffold protein for kinases and phosphatases. Recent Prog Horm res.; 52: 409-29

5) Edwards AS, Scott JD (2000). A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond. Current Opinion in Cell Biology, vol 12, issue 2: 217-221.

6) Taylor S.S. et al (2003). PKA: a portrait of protein kinase dynamics. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), vol 1697, issue 1-2: 259-269.

7) Witczak O. et al (1999). Cloning and characterization of a cDNA encoding an A-kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450.The EMBO journal, vol 18 NO. 7: 1858-1868.

8) Cooper and Hausmann. The Cell - a molecular approach, 3.edition

9) Skålhegg B. et al. Utkast til artikkel: "Characterization of the two RII-binding domains of AKAP450".

10) Herberg FW. et al (1999). Analysis of A- kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding. Journal of Molecular Biology, vol 298, issue 2; 329-339

11) Takahaski M. et al (1999). Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signalling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. Journal of Biological Chemistry, June 11: 17267-74.

12) Shanks RA, Goldenring JR et al (2002).AKAP350 at the Golgi apparatus.Identification of a distinct Golgi apparatus targeting motif in AKAP350. Journal of Biological Chemistry, October 25; 40967-72.

13) Lin JW. et al (1998).Yotiao, a novel protein of neuromuscular junction and brain that interacts with specific splice variants on NMDA receptor subunit NRI. The Journal of Neuroscience, March 15, 18 869: 2017-2027.

14) Dransfield DT, Goldenring JR et al (1997).Identification and characterization of a novel A-kinase anchoring protein (AKAP120) from rabbit gastric parietal cells. Biochemical Journal, March 15; 322; 801-8.

15) Collas P. et al (1999). The A-Kinase Anchoring protein AKAP95 is a multivalent protein with a key role in chromatin condensation at mitosis. The Journal of Cell Biology, vol 147, number 6, des: 1167-1180.

- 16) Keryer G *et al*** (1993). A high-affinity binding protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II in the centrosome of human cells. *Experimental Cell Research*, vol 204, issue 2, Feb: 230-240.
- 17) Nigg *et al*** (1985). Cyclic-AMP-dependent protein kinase type II is associated with the Golgi complex and with centrosomes. *Cell*, 41: 1039-51.
- 18) Witzcak O. *et al***. Utkast til artikkel: A-kinase anchoring protein AKAP450 participates in the centrosomal localization of the Golgi apparatus.
- 19) Beebe, S.J. *et al*** (1990). Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis representing a third isoform for the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase. *Molecular Endocrinology*, Vol 4; 465-475.
- 20) Tasken, K. *et al*** (1997). Structure, function and regulation and human cAMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, Vol. 274, Issue 9, 5370-5378, February 26.
- 21) Doskeland S.O. *et al*** (1993). The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase-functionally different or redundant? *Biochim Biophys Acta*. 1993 Sep 13; 1178 (3):249-58.
- 22) Corbin, J.D. *et al*** (1975). The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase in adipose, cardiac and other tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 250; 218-25.
- 23) Keryer G. *et al*** (1999). Differential localization of protein kinase A type II isozymes in the Golgi-centrosomal area. *Exp Cell Res*. May 25;249(1):131-46
- 24) Vallee R. B. *et al*** (1981). A protein kinase bound to the projection portion of MAP2 (microtubule-associated protein 2). *Journal of Cellular Biology*, 90; 568-76.
- 25) Muniz M. *et al*** (1997). Protein kinase A activity is required for the budding of consecutive transport vesicles from the trans-Golgi network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 23;94(26):14461-6.
- 26) Eker P. *et al*** (1994). Selective regulation of apical endocytosis in polarized Madin-Darby canine kidney cells by mastoparan and cAMP. *J Biol Chem*. Jul 15; 269 (28):18607-15.
- 27) Doxsey S.J. *et al*** (1994). Pericentrin-a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organisation. *Cell*. February 25; 76(4):639-50.
- 28) Gardiol A. *et al*** (1999). Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery. *The Journal of Neuroscience*, January 1, 19(1):168-179.
- 29) Jasmin *et al*** (1989). Golgi apparatus in chick skeletal muscle. Changes in its distribution during end plate development and after denervation. *Proc Natl Acad Sci USA*. Sep;86(18):7218-22.
- 30) Itoh T.J. *et al*** (1997). Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics. *Biochemistry*, Oct 14; 36(41):12574-82
- 31) Carlson C.R. *et al*** (2001). CDK1-mediated phosphorylation of the RII regulatory subunit of PKA works as a molecular switch that promotes dissociation of RII from centrosomes at mitosis. *Journal of Cell Science*, 114:3243-3254.
- 32) Schmidt PH. *et al*** (1999). AKAP350, a multiply spliced protein kinase A anchoring protein associated with centrosomes. *J Biol Chem*. Jan 29;274(5):3055-66.

